

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-234040

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和62年(1987)10月14日

C 07 C 49/737
 C 12 P 7/26
 // A 61 K 31/12
 (C 12 P 7/26
 C 12 R 1:645)

ADU

7188-4H
 7236-4B
 7330-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

③ 発明の名称 DC1043物質およびその製法

① 特 願 昭61-76297

② 出 願 昭61(1986)4月2日

⑦ 発 明 者 中 野 洋 文 町田市旭町1-12-3
 ⑦ 発 明 者 原 光 信 町田市成瀬2-10-2 ポプラケ丘コープ11-202
 ⑦ 発 明 者 川 本 勲 平塚市ふじみ野1-21-2
 ⑦ 発 明 者 安 藤 勝 彦 町田市中町3-9-11 協和アパートB-2
 ⑦ 発 明 者 森 本 眞 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 清和寮
 ⑦ 発 明 者 芦 沢 忠 沼津市大岡3236-13
 ⑧ 出 願 人 協和醸造工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

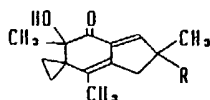
一般式

1. 発明の名称

DC1043物質およびその製法

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式



(式中、RはCH₃、又はCH₂OHを表す)で表されるDC1043物質。

- (2) プレウロータス属に属し、DC1043物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中にDC1043物質を生成蓄積させ、該生成蓄積したDC1043物質を採取することを特徴とするDC1043物質の製法。

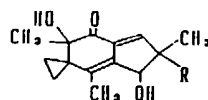
3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、DC1043物質およびその製法に関する。DC1043物質は抗腫瘍作用を有し、抗腫瘍剤として有用である。

従来技術

従来、抗腫瘍抗生物質として



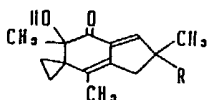
(式中、RはCH₃(イルジンM)又はCH₂OH(イルジンS)を表す)で表されるイルジン類が知られている〔メルクインデックス(Merck Index)10版、第714頁〕。

発明が解決しようとする問題点

優れた抗腫瘍作用を有する物質は常に求められている。

問題点を解決するための手段

本発明は一般式



(式中、RはCH₃、又はCH₂OHを表す)で表される抗腫瘍作用を有する新規物質、DC1043物質に関する。上記一般式において、R=CH₃の化合物をDC1043A、R=CH₂OHの化合物をDC1043Bとそれぞれ称す。

以下にDC1043A及びDC1043Bの理化学的性質を示す。

(1) DC1043Aの理化学的性質

①元素分析値：C：77.59%、H：8.62%、
O：13.79%

②分子量：232

③分子式：C₁₅H₂₀O₃

④紫外吸収スペクトル (MeOH 中) 300nm
(極大吸収を示す波長)

⑤紫外吸収スペクトル (KBr 錠剤法) :
第1図

⑥PMRスペクトル (DMSO-d₆ 中、TMS基準)
0.32 (1H, m), 0.63 (1H, m), 0.81 (1H, m),
0.98 (1H, m), 1.10 (3H, s), 1.13 (3H, s),
1.18 (3H, s), 1.43 (3H, s), 2.43 (2H, s),
4.89 (1H, s), 6.47 (1H, s)

⑦CMRスペクトル (DMSO-d₆ 中、TMS基準)
5.0, 7.6, 14.5, 24.5, 27.9, 28.7, 31.5,
42.9, 44.0, 75.9, 126.6, 135.9, 136.0,
147.2, 199.8

⑧溶解性：クロロホルム, DMSO, メタノール, 酢酸エチル, アセトンに易溶、水には難溶。

⑨薄層クロマトグラフィー：シリカゲル薄層
(Kieselgel 60 Art 5715, E. Merck社製)
でトルエン：アセトン (7 : 3 V/V) の展

難溶。

⑩薄層クロマトグラフィー：シリカゲル薄層
(Kieselgel 60 Art 5715, E. Merck社製)
でトルエン：アセトン (7 : 3 V/V) の展
開系でR_fは0.64であり、ヘキサン：酢
酸エチル (7 : 3 V/V) の展開系でR_fは
0.3である。

次に、DC1043A及びDC1043Bの抗
菌作用、急性毒性及び抗腫瘍作用について説明す
る。

1) 抗菌作用

各種細菌に対する最少生育阻止濃度 (MIC)
を寒天稀釈法 (pH7.0) により測定し、その
結果を第1表に示す。

開系でR_fは0.84であり、ヘキサン：酢
酸エチル (20 : 1 V/V) の展開系でR_f
は0.3である。

(2) DC1043Bの理化学的性質

①元素分析値：C：72.58%、H：8.06%、
O：19.35%

②分子量：248

③分子式：C₁₅H₂₀O₃

④紫外吸収スペクトル (MeOH 中) 320nm
(極大吸収を示す波長)

⑤赤外線吸収スペクトル (KBr 錠剤法) :
第2図

⑥PMRスペクトル (DMSO-d₆ 中、TMS基準)
0.32 (1H, m), 0.64 (1H, m), 0.81 (1H, m),
1.02 (1H, m), 1.09 (3H, s), 1.20 (3H, s),
1.44 (3H, s), 2.23 (1H, d), 2.59 (1H, d),
3.30 (2H, m), 4.82 (1H, t), 4.86 (1H, s),
6.48 (1H, s)

⑦CMRスペクトル (DMSO-d₆ 中、TMS基準)
5.1, 7.7, 14.5, 23.9, 24.7, 31.6, 38.3,
50.4, 68.1, 76.1, 121.5, 136.2, 137.6,
144.9, 199.7

⑧溶解性：クロロホルム, DMSO, メタノール, 酢酸エチル, アセトンに易溶、水には

第 1 表

試 験 菌 名	MIC (μg/ml)	
	DC1043A	DC1043B
スタフィロコッカス アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC6538P	>100	>100
バチルス・ズブチリス (<i>Bacillus subtilis</i>) No10707	50	>100
クレブシエラ・ニューモニアエ (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) ATCC10031	>100	>100
エシェリキア・コリ (<i>Escherichia coli</i>) ATCC26	>100	>100
シゲラ・ゾンネイ (<i>Shigella sonnei</i>) ATCC9290	>100	>100
サルモネラ・タイホーサ (<i>Salmonella typhi</i>) ATCC9992	>100	>100

2) 急性毒性

マウスに対する腹腔内投与におけるDC1043
A及びDC1043Bの急性毒性の値 (LD₅₀)
は、それぞれ20mg/kg及び5mg/kgである。

3) 抗腫瘍作用

実験例1.

サルコーマ180固型腫瘍に対する治療効果
 体重約20gのddY雄マウス1群6匹に、サルコーマ180腹水型腫瘍細胞 5×10^6 個を腹腔部皮下に移植した。移植後24時間目に第2表に示す濃度のDC1043Aを5日間連続投与した。

DC1043Aは水にはほとんど溶けないので、DC1043A10mgあたり25mgのTween80を加えよく混和し、これに磷酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液を加えて懸濁液を作製した。これをPBSで希釈して必要な濃度の溶液を作製した。このときTween80のみを含む同様の溶液を対照として使用しているが、これは実験動物に全く影響を与えなかった。

PBSの組成はNaCl 0.8g/dl, KCl 0.02g/dl, Na_2HPO_4 1.15g/dl, KH_2PO_4 0.02g/dl, pH7.2のものである。比較例として、腫瘍細胞移植後、24時間にイルジンSを含むPBS溶液0.2mlを1回腹腔内に投与した。

移植7日後のT/C〔T:試験例の平均腫瘍体積(mm^3)、C:対照例(PBS溶液0.2mlを腹腔内投与したもの)の平均腫瘍体積(mm^3)〕を測定し

た。その結果を第2表に示す。

第 2 表

試験物質	投与量 (mg/kg)	投与日数	T/C
DC1043A	2.5	5	0.94
	5	5	0.53
	10	5	死亡
イルジンS	12.5	1	0.65

実験例2.

リンホサイティック・リウケミアP-388腫瘍に対する治療効果

体重約22gのCDF₁雄マウス1群5匹に、リンホサイティック・リウケミア(Lymphocytic leukemia) P-388腫瘍細胞 1×10^6 個を腹腔内移植した。移植後24時間目にDC1043Aの溶液0.2mlを5日間連続して腹腔内に投与した。

比較例として、イルジンSをDC1043Aと同様に投与した。

移植後の平均生存日数及び延命率T/C(%)

$$\left(\frac{\text{試験例の平均生存日数}}{\text{対照例の平均生存日数}} \times 100 \right)$$

を測定した。その結果を第3表に示す。

第 3 表

試験物質	投与量 (mg/kg)	投与日数	平均生存日数	T/C (%)
DC1043A	2.5	5	11.8	118
	5	5	12.4	124
	10	5	5.8	58
イルジンS	12.5	5	10.5	105
	25	5	6.9	69

次に、DC1043物質の製造法について説明する。使用する微生物としては、プレウロータス属に属し、DC1043物質を生産する能力を有するものであればいずれも用いられる。その具体例としては、プレウロータス・ジャポニカ(Pleurotus japonicus) ATCC 20195があげられる。

本発明に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機物質を程よく含有していれば天然培地又は合成培地のいずれも用いられる。

炭素源としては、ブドウ糖、澱粉、デキストリン、マンノース、フラクトース、シュクロース、糖蜜、アルコール類(メタノール、エタノール等)、有機酸(酢酸、ギ酸、クエン酸、リンゴ酸等)等が用いられる。

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アン

モニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸等が用いられる。

無機物としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸第1鉄、硫酸マンガ、硫酸銅、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム等が用いられる。

さらに必要に応じて、DC1043物質の生産を促進する物質、例えば、ビオチン、ビタミン等を培地に添加してもよい。

培養法としては、液体培養法、とくに深部攪拌培養法がもっとも適している。培養温度は20~35℃、好ましくは22~30℃で、培地のpHはアンモニア水、炭酸アンモン溶液などを添加して、pH4~8、好ましくは5~7に調整する。液体培養で通常1日ないし7日培養を行うと、DC1043物質が培養液中に生成蓄積される。培養液中の生成量が最大に達したときに培養を停止し、菌体を浮別して得られる培養液中よりDC1043物質を精製単離する。

培養液からのDC1043物質の単離精製には、微生物代謝生産物を、その培養液から単離す

るためにふつう用いられる分離、精製の方法(例えば、抽出法、イオン交換樹脂法、シリカゲル法)が利用される。

以下本発明の態様を実施例によって説明する。

実施例1.

種菌としては、プレウロタス・ジャポニカ ATCC 20195を用いた。

該菌株の1白金耳を300ml容量の三角フラスコ中の下記組成の種培地50mlに植菌し、25℃で48時間振とう培養した。

種培地組成: ペプトン5g/l, エビオス5g/l, グルコース10g/l, 野菜ジュース200ml/l, CaCO_3 3g/l, pH6.0

種培養液を30l容量のジャーフェーマンター中の下記組成の発酵培地18lに5%(容量)の割合で移し、25℃で通気攪拌方式(回転数350r.p.m. 通気量18l/min)により培養を行った。発酵培地組成: シュクロース50g/l, 乾燥酵母20g/l, KH_2PO_4 0.5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, CaCO_3 0.5g/l, pH7.0

培養中培地のpHは制御しないで、200時間培養した。培養液より菌体および沈殿物を分別し、母液15lを得た。母液のpHを塩酸で5に調整

した後、該液を0.8lの非イオン性多孔性樹脂(商品名「グイェイオンSP207」三菱化成社製)に通塔して活性物質を吸着させた。水:メタノール(4:1V/V)の3lで、不純物を溶出後、メタノールで活性物質を溶出した。

メタノール溶出区分6lを約200mlまで濃縮し、少量のクロマトグラフィー用シリカゲル(関東化学社製)にまぶして粉末状とした。この粉末サンプルを、予めトルエンで懸濁後カラムに充填したシリカゲル(100ml)のカラムにのせた後、トルエンを通塔することによって不純物を除去した。次いでトルエン:アセトン(50:1V/V)で溶出するとDC1043Aを含む画分が溶出された。次いでトルエン:アセトン(20:1V/V)で溶出するとDC1043Bを含む画分が溶出された。これらの各々の活性画分をさらにシリカゲル(Lichroprep Si 60 Merck社製)を用い、中程度の圧力をかけながら、ヘキサン、酢酸エチル系の溶媒で展開すると、ヘキサン:酢酸エチル(20:1V/V)でDC1043Aの画分が溶出された。次いで、ヘキサン:酢酸エチル(7:3V/V)でDC1043Bの画分が溶出された。それぞれの画分を集め濃縮して、純粋なDC1043A 30mg及びDC1043B 120mgを得た。

実施例2.

実施例1において発酵培地組成を次のものに代えて行う以外は実施例1と同様に行いDC1043A 15mg及びDC1043B 80mgを得た。

発酵培地組成: デキストリン50g/l, 大豆粉20g/l, CaCO_3 5g/l, KH_2PO_4 0.5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, pH7.0

発明の効果

DC1043物質は優れた抗腫瘍作用を示す。

3. 図面の簡単な説明

第1図はDC1043Aの赤外部吸収スペクトルを示す。

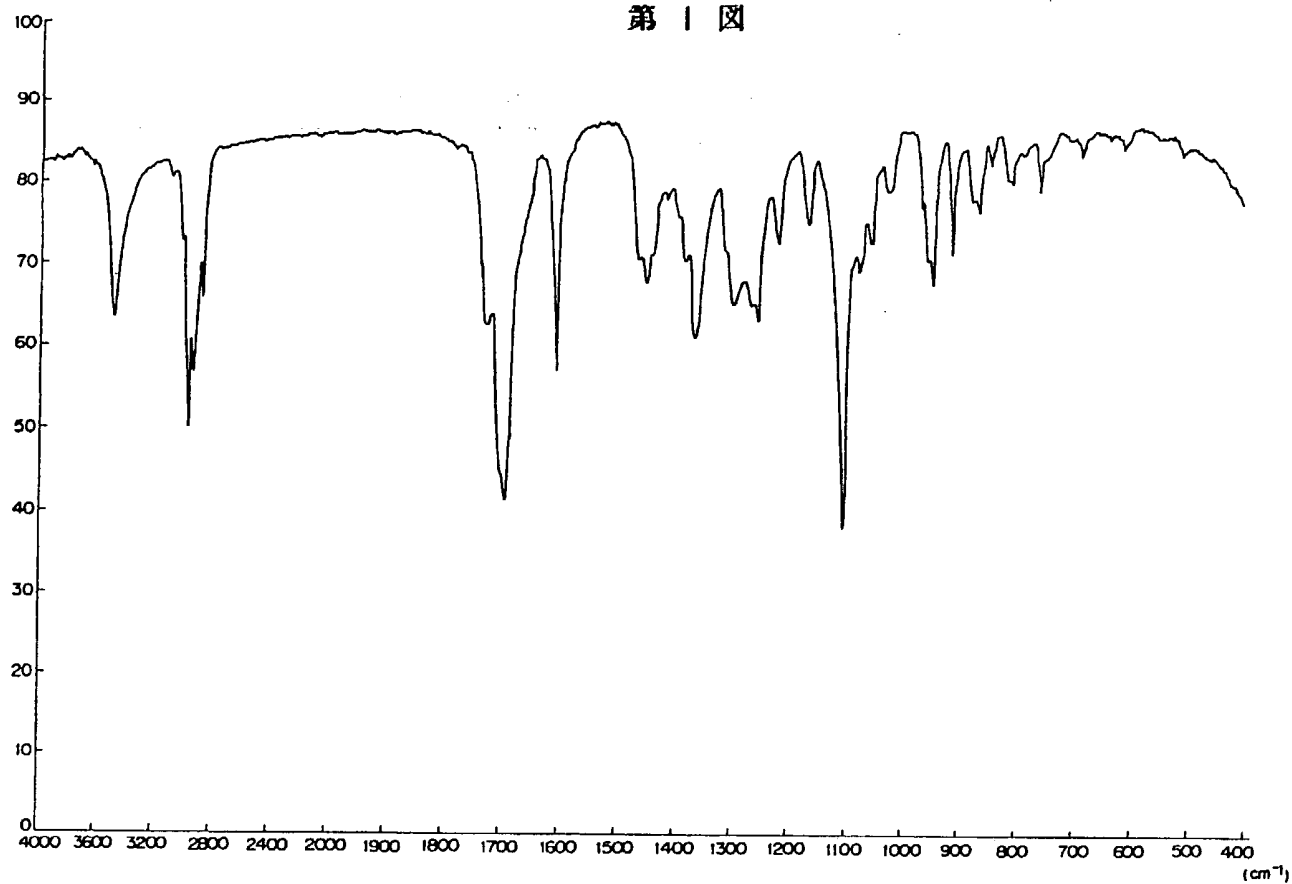
第2図はDC1043Bの赤外部吸収スペクトルを示す。

特許出願人 (102) 協和醗酵工業株式会社

代表者 加 藤 幹 夫



第 1 図



第 2 図

